

19/08/930



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 29 402 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 196 29 402.9
⑳ Anmeldetag: 20. 7. 96
㉑ Offenlegungstag: 5. 2. 98

⑤① Int. Cl.⁶:
A 01 H 5/00
A 01 H 1/00
C 12 N 15/82
C 12 N 15/87
C 12 P 1/00
A 01 H 1/02
B 09 C 1/00
C 02 F 3/32
// A23L 1/00, A23K
1/14

DE 196 29 402 A 1

⑦① Anmelder:
Voeste, Dirk, Dr., 44801 Bochum, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln

⑦② Erfinder:
Voeste, Dirk, Dr., 44892 Bochum, DE; Barth, Stefan,
Dr., 50674 Köln, DE; Andriske, Michael, Dr., 44801
Bochum, DE; Blüm, Volker, Dr., 44797 Bochum, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
DE 41 33 920 C1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verwendung von transformierten vaskulären Wasserpflanzen zur Produktion von arteigenen oder artfremden Substanzen

⑤⑦ Transformierte vaskuläre Wasserpflanzen erhältlich durch Transformation einer vaskulären Wasserpflanze mit genetischem Material in an sich bekannter Weise.

DE 196 29 402 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 12. 97 702 066/13

5/29

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind transformierte vaskuläre Wasserpflanzen, insbesondere solche der Gattung *Wolffia*, ein Verfahren zur Transformation von vaskulären Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Kultivierung von transformierten Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Herstellung von Substanzen mittels der erfindungsgemäßen transformierten Wasserpflanzen, ein Verfahren zur Kreuzung von transformierten Wasserpflanzen der erfindungsgemäßen Art sowie die Verwendung der erfindungsgemäß transformierten vaskulären Wasserpflanzen.

Ein Ziel der industriellen Biotechnologie auf Basis der Molekularbiologie ist die Produktion von Substanzen, die durch Substanzen, die durch chemische Totalsynthese nur äußerst schwierig zu erhalten sind, wenn überhaupt. Dazu gehören insbesondere hochmolekulare, biologisch oder pharmakologisch wirksame Substanzen, wie beispielsweise Fette, Kohlenhydrate, Vitamine sowie Peptide oder Proteine, beispielsweise Antikörper, hochmolekulare, heterogene Konjugate und Fusionsproteine (z. B. Immunttoxine), aber auch niedermolekulare Substanzen. Durch gentechnologische Methoden können in der Regel genetisch veränderte Organismen hergestellt werden, die entweder in ihr Genom integrierte oder extrachromosomale, genetisch veränderte Information tragen. Als die üblicherweise in Betracht kommenden Systeme haben sich prokaryotische Zellen, insbesondere *E. coli*-Bakterien aber auch Hefen, die als nicht typische eukaryotische Zellen über einen komplexeren Stoffwechselapparat verfügen, etabliert.

Auch Pflanzen sind grundsätzlich genetisch veränderbar, jedoch hat sich die Pflanzen-Gentechnologie überwiegend auf die Beschleunigung von Züchtungsergebnissen konzentriert. Hierbei ist insbesondere die Einbringung von Resistenzgenen in Kulturpflanzen zu nennen, um diese Pflanzen beispielsweise gegen Krankheitserreger oder Herbizide resistent zu machen.

Pflanzen sind auch in biotechnologischen Anlagen gezüchtet worden, beispielsweise um die Biomasse dieser Pflanzen zu steigern. Dem Eingang von Pflanzen in komplexeren gentechnologischen Prozessen steht insbesondere als Hindernis entgegen, daß regelmäßig eine geringe Produktionsleistung der Stoffwechselprodukte negativ in Erscheinung tritt und Pflanzen sich regelmäßig nachteilig durch lange Generationszyklen und geringem Biomassezuwachs auszeichnen. Desweiteren ist nachteilig, daß gentechnisch veränderte Pflanzen kaum auf Akzeptanz bei Freilandversuchen stoßen. Eine Kultivierung von Pflanzen in geschlossenen Anlagen, wie beispielsweise Fermentern, ist jedoch nur äußerst selten möglich.

Nun ist es aber wünschenswert, den Syntheseapparat von Pflanzen auch der Gentechnik im engeren und weiteren Sinne zur Verfügung zu stellen, um mit Hilfe von Pflanzen komplexere Stoffwechselprodukte, insbesondere Biomoleküle, herzustellen, die sich insbesondere durch ihre Komplexität und/oder ihre Toxizität in anderen Expressionssystemen auszeichnen. Mithin besteht ein der Erfindung zugrundeliegendes technisches Problem darin, geeignete Pflanzen oder Pflanzensysteme für die Biotechnologie bereitzustellen. Die zu verwendenden Pflanzen sollen dabei in unproblematischer Weise züchtbar und der genetischen Transformation zugänglich sein.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem wird durch eine transformierte vaskuläre Wasser-

pflanze gelöst. Die Wasserpflanze ist erhältlich durch Transformation einer vaskulären Wasserpflanze mit genetischem Material, das für die gewünschte Substanz kodiert oder dessen Expression induziert und in die Wasserpflanze eingebracht werden kann. Erfindungsgemäß geeignet sind insbesondere Wasserpflanzen der Familie der Wasserlinsengewächse (*Lemnaceae*). Besonders bevorzugt ist hierbei die zur Gattung der *Wolffia* gehörende vaskuläre Wasserpflanze, besonders bevorzugt die Familie *Wolffia arrhiza*.

Die wurzellose Wasserpflanze *Wolffia arrhiza* (*L.*, Wasserlinse) gehört zu der Familie der *Lemnaceae* und gilt als die kleinste Blütenpflanze der Welt. Der Durchmesser der Blüten beträgt ca. 1 bis 1,5 mm. Die Pflanze kommt sowohl in tropischen wie auch in gemäßigten Klimabereichen vor und bildet dort auf Gewässern einen dichten "Pflanzenteppich". Neben der sexuellen Vermehrung spielt besonders die Vegetativvermehrung durch Knospung eine entscheidende Rolle für die Verbreitung dieser Art. Der hohe Biomassezuwachs, der mit *Wolffia arrhiza* verbunden ist, führt dazu, daß im asiatischen Raum in Teichen angezogene *Wolffia arrhiza* frühzeitig als Nahrungsmittel für Menschen und Tiere genutzt wurde. Für die Ernährung vorteilhaft war, daß sich der Protein- und Lipidgehalt von *Wolffia* mit den von herkömmlich angebauten Getreiden vergleichen läßt, wie Bhanthumnavin K. (1971), "Wolffia arrhiza as a possible source of inexpensive protein, *Nature* 232: 495 und Engst et al. (1991) in *Nahrung* 35: 695-710 beschrieben haben. Diese Ergebnisse verbunden mit dem kostengünstigen Anbau dieser Pflanzen führte dazu, daß die Wasserlinse als alternative Quelle für preiswertes Protein und Fett in den Mittelpunkt des Interesses rückte. So betrifft auch die DE 41 33 920 01 die Verwendung von *Lemnaceae* zur Herstellung eiweißarmer, pektinreicher zellstrukturierter Materialien mit großem Wasserbindevermögen.

In Biologie in unserer Zeit, 26. Jahrgang, 1996, Nr. 3, Seiten 187 ff. beschreiben K.-J. Appenroth und H. Augsten Wasserlinsen und ihre Nutzung.

Die Transformation der vaskulären Wasserpflanze erfolgt durch Verfahren, die es der Wasserpflanze ermöglichen, genetisches Material aufzunehmen. Es kommen hierzu insbesondere auch an sich bekannte Verfahren in Betracht. Vorzugsweise erfolgt die Transformation der vaskulären Wasserpflanzen zur *Agrobacterium* vermittelten Transformation, virale Infektion, Transformation nach PEG- oder Calciumchloridbehandlung, Elektroporation, Mikroinjektion, Liposomenfusion, Aufnahme freier DNA in Kokultur, Particle Bombardement, Glass-bead wounding und/oder laserinduzierte Transformation in Frage.

Die zur Transformation der Wasserpflanzen zu verwendenden Systeme sind nach dem Stand der Technik konstruierte Nukleotidstrukturen, die beispielsweise für Promotoren, Signalsequenzen, die erwünschten Zielsequenzen, Markergene und/oder ähnliche codieren. Die Expression kann verstärkt werden durch gegebenenfalls Kombination mit Silencer-, Enhancersequenzen und/oder Transkriptionsfaktoren und/oder Chaperonen, deren Expression aber auch durch Kultivierung unter definierten Bedingungen, beispielsweise unter Zusatz von Streßfaktoren (wie z. B. Hitze, Kälte, Salze, Alkohol) induziert werden kann.

Erfindungsgemäß erfolgt die Kultivierung der transformierten Wasserpflanzen in offenen oder geschlossenen Bioreaktoren. Hierbei kann in vorteilhafter Weise auch darauf zurückgegriffen werden, daß insbesondere

die Wasserlinse *Wolffia arrhiza* als Submers-Kultur ge-
züchtet werden kann. In einer alternativen Ausführ-
ungsform ist es jedoch auch möglich, diese Pflanzen in
Aquarien, offenen oder geschlossenen Becken zu züch-
ten. Eine etwas aufwendigere Behandlung verlangt die
Anzüchtung der erfindungsgemäß transformierten
Wasserpflanzen als Protoplastenkultur in wäßrigen Sys-
temen und/oder in immobilisierter Form auf oder ad-
sorbiert an oder auf Trägern. Sofern notwendig und
möglich, kann die erfindungsgemäße transformierte
Wasserpflanze auch als Kalluskultur sowie als Suspen-
sionskultur isolierter Zellen oder auf Agar kultiviert
werden. Die Auswahl der jeweiligen Kulturbedingun-
gen richtet sich insbesondere nach den Bedürfnissen der
Pflanzenkultur. Dabei kann zur Auswahl des geeigneten
Kultivierungsverfahrens auch die Aufarbeitung der
Pflanzen berücksichtigt werden, je nach dem, ob bei-
spielsweise die Pflanzen die durch die Transformation
zu synthetisierende Substanz in die Umgebung abgeben
oder im Zellinneren akkumulieren. So kann es beispie-
lsweise vorteilhaft sein, den durch die Transformation ge-
bildeten Stoff in das Medium abgeben zu lassen, um dort
kontinuierlich den interessierenden Stoff zu isolieren
oder in der Pflanze anzureichern, um beispielsweise eine
orale Applikation zu ermöglichen.

Die Kultivierung kann unterstützt werden, in dem die
benötigten Nährstoffe der Wasserpflanze zugeführt
werden. Dies ist in besonders vorteilhafter Weise in
klassischen Zellkultursystemen aber auch in Kultursy-
stemen, wie Fermentationsanlagen, möglich.

Vorteilhaft an der erfindungsgemäßen Verfahrens-
weise unter Verwendung von vaskulären Wasserpflan-
zen ist insbesondere die Tatsache, daß die Pflanzen so-
wohl sexuell, wie auch durch Protoplastenfusion ge-
kreuzt werden können. Dies ist vorteilhaft, weil durch
die freie und erleichterte Kombination rekombinanter
Einzelstrukturen die Produktion komplexer Multido-
män-Strukturen ermöglicht wird (Ma und Hein (1995),
"Plant antibodies and immunotherapy", Plant Physiol.
109: 341—346).

Die erfindungsgemäße Verwendung von transfor-
mierten vaskulären Wasserpflanzen zur gentechnischen
Herstellung von Substanzen beruht darauf, daß auch
kompliziertere Moleküle durch Expression von Genen
in gentechnisch veränderten Organismen zugänglich
werden. So können insbesondere mit dem erfindungsge-
mäßigen System aus transformierten Wasserpflanzen re-
kombinante Immunttoxine hergestellt werden. Nach
PCR-Amplifikation der variablen Domänen monoklo-
naler Antikörper werden diese über einen synthetischen
Linker miteinander verbunden. Es entsteht ein einzel-
strängiges variables Fragment (scFv), das ähnliche Affi-
nität aufweisen kann, wie der parentale Antikörper. Die-
se Fragmente sind durch Einsatz von bakteriophagen
Systemen herstellbar und beispielsweise durch Chain
Shuffling humanisierbar. Es kommt insbesondere scFv
in Betracht, die an Zellstrukturen zellulärer Oberflächen
binden, die möglichst ausschließlich, oder in besonders
hoher Anzahl (beispielsweise an bekannten Rezeptor-
strukturen: CD25, CD30, CD40, CD80, GD2 usw.) auf
bestimmten Zellen zu finden sind. Die Expression biolo-
gisch-aktiver, rekombinanter Fusionsproteine in *E. coli*
ist häufig problematisch, da einerseits eine starke pro-
teolytische Degradation und andererseits eine sehr
niedrig effiziente Synthese zu verzeichnen ist. Die erfin-
dungsgemäß zu verwendenden erfindungsgemäßen
transformierten Wasserpflanzen schaffen hier Abhilfe.

Patentansprüche

1. Transformierte vaskuläre Wasserpflanzen erhält-
lich durch Transformation einer vaskulären Was-
serpflanze mit genetischem Material in an sich be-
kannter Weise.
2. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach
Anspruch 1 die zur Familie der Wasserlinsenge-
wächse (Lemnaceae) gehört.
3. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach
Anspruch 2 zur Gattung der *Wolffia* gehörend.
4. Transformierte vaskuläre Wasserpflanze nach
Anspruch 3, mit der Bezeichnung *Wolffia arrhiza*.
5. Verfahren zur Transformation von vaskulären
Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
wobei die Wasserpflanzen nach mindestens einem
der Ansprüche 1 bis 4 transformiert werden durch
ein Verfahren, das es der vaskulären Wasserpflanze
ermöglicht, genetisches Material aufzunehmen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Transfor-
mation erfolgt durch *Agrobacterium* vermittelte
Transformation, virale Infektion, Transformation
nach PEG- oder CaCl_2 -Behandlung, Elektropora-
tion, Mikroinjektion, Liposomenfusion, Aufnahme
freier DNA in Kokultur, Particle-Bombardement
und/oder laserinduzierte Transformation, glass-be-
ad wound.
7. Verfahren zur Kultivierung von transformierten
Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4
in offenen oder geschlossenen Bioreaktoren, als
Submerskultur, in Aquarien, offenen oder geschlos-
senen Becken, als Protoplastenkultur in wäßrigen
Systemen und/oder immobilisiert auf oder an Trä-
gern, als Kalluskultur, Suspensionskultur von iso-
lierten Zellen oder auf Agar.
8. Verfahren zur Herstellung von arteigenen und
artfremden Substanzen, wobei transformierte vas-
kuläre Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche
1 bis 4 kultiviert werden gemäß einem der Verfah-
ren nach Anspruch 7.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8 zur Isolierung von
produzierten Substanzen entweder aus dem Kul-
turmedium oder aus den transformierten vaskulä-
ren Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1
bis 4.
10. Verfahren zur Kreuzung von transformierten
Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
wobei entweder eine sexuelle Kreuzung oder eine
Protoplastenfusion durchgeführt wird.
11. Verwendung von transformierten vaskulären
Wasserpflanzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis
4 zur gentechnischen Herstellung von Substanzen.
12. Verwendung gemäß Anspruch 11, wobei re-
kombinante Immunttoxine hergestellt werden.
13. Verwendung von transformierten vaskulären
Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4
als mögliche Nahrungsquelle für Mensch und Tier.
14. Verwendung von transformierten vaskulären
Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4
als als Zeigerorganismus oder Bioindikator zur De-
tektion von Stoffen, zum Beispiel toxischen, chemi-
schen oder organischen Verbindungen oder Herbi-
ziden.
15. Verwendung von transformierten vaskulären
Wasserpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 4
zur Dekontamination von Böden und Gewässern
(beispielsweise Verbesserung der Nitrataufnahme,
Wasserregeneration).